

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-121863

(43)Date of publication of application : 13.05.1997

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

A01H 5/00

C07H 21/04

C12N 5/10

C12N 9/04

(21)Application number : 07-285839

(71)Applicant : SUMITOMO CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 02.11.1995

(72)Inventor : MACHIDA YASUNORI
MURANAKA TOSHIYA
OITA KENJI

(54) MODIFICATION OF PLANT AND MODIFIED PLANT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To increase activities of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (hereinafter referred to as HMG-CoA) reductases in a plant by modifying a gene of the HMG-CoA reductase so that a protein kinase having the phosphorylating ability may not substantially manifest the activities and transducing the resultant modified gene into a plant cell.

SOLUTION: An expression cassette having (A) a promoter capable of functioning in a plant cell, (B) a gene of a protein kinase modified so that the protein kinase capable of manifesting the in vitro phosphorylating activities of serine at the 7th position from the N-terminal of a peptide having an amino acid sequence of the formula may not substantially manifest the activities and (C) a terminator capable of functioning in the plant cell in a form enabling the functions, is transduced into a cell of the plant having HMG-CoA reductase activities in catalyzing the production of mevalonic acid.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Ref. #15

MTC 6783.1

Balasulojini Karunanandaa

09/885,723

Exp. Mail Label No. 757695919 US

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-121863

(43)公開日 平成9年(1997)5月13日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 0 1 H 5/00			A 0 1 H 5/00	A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 5/10			C 1 2 N 9/04	Z
9/04			5/00	C
審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 11 頁)				

(21)出願番号 特願平7-285839

(22)出願日 平成7年(1995)11月2日

(71)出願人 000002093

住友化学工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

(72)発明者 町田 泰則

愛知県名古屋市千種区北千種一丁目9番3号 仲田住宅R J 103

(72)発明者 村中 俊哉

兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社内

(72)発明者 大江田 憲治

兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社内

(74)代理人 弁理士 久保山 隆 (外1名)

(54)【発明の名称】 植物の改変方法及び改変植物

(57)【要約】 (修正有)

【課題】植物細胞内でHMG-CoA リダクターゼを効率よく脱リン酸化状態にする技術を提供する。

【解決手段】3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイムA (HMG-CoA) リダクターゼ活性を有する植物の細胞内に、植物細胞内で機能可能なプロモーター、配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼの遺伝子、及び植物細胞内で機能可能なターミネーター、を機能可能な形で有する発現カセットを導入することにより該植物内でのHMG-CoA リダクターゼ活性を増加させる方法及び、同発現カセットが細胞内に導入された植物。

【特許請求の範囲】

【請求項1】3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイムA (HMG-CoA) リダクターゼ活性を有する植物の細胞内に、(1) 植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2) 配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼの遺伝子、及び(3) 植物細胞内で機能可能なターミネーター、を機能可能な形で有する発現カセットを導入することにより該植物内でのHMG-CoA リダクターゼ活性を増加させる方法。

【請求項2】3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイムA (HMG-CoA) リダクターゼ活性を有する植物の細胞内に、(1) 植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2) 配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼの触媒領域のサブドメインIIにおいて保存されているリジンを経他のアミノ酸に置換することにより得られるプロテインキナーゼの遺伝子、及び(3) 植物細胞内で機能可能なターミネーター、を機能可能な形で有する発現カセットを導入することにより該植物内でのHMG-CoA リダクターゼ活性を増加させる方法。

【請求項3】3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイムA (HMG-CoA) リダクターゼ活性を有する植物の細胞内に、(1) 植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2) HMG-CoA リダクターゼをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼの遺伝子、及び(3) 植物細胞内で機能可能なターミネーター、を機能可能な形で有する発現カセットを導入することにより該植物内でのHMG-CoA リダクターゼ活性を増加させる方法。

【請求項4】(1) 植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2) 配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼの遺伝子、及び(3) 植物細胞内で機能可能なターミネーター、を機能可能な形で有する発現カセットが細胞内に導入された植物。

【請求項5】(1) 植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2) 配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼの触媒領域のサブドメインIIにおいて保存されているリジンを経他のアミノ酸に置換することにより得られるプロテインキナーゼの遺伝子、及び(3) 植物細胞内で機能可能なターミネーター、を機能可能な形で有する発現カセ

ットが細胞内に導入された植物。

【請求項6】(1) 植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2) HMG-CoA リダクターゼをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼの遺伝子、及び(3) 植物細胞内で機能可能なターミネーター、を機能可能な形で有する発現カセットが細胞内に導入された植物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、植物の改変方法及び改変植物に関する。

【0002】

【従来の技術】植物における酢酸メバロン酸経路では、まず、3分子のアセチルCoA の縮合によって生じる炭素数6の化合物が還元されてメバロン酸が生成される。次に、メバロン酸の脱炭酸によって生じる炭素数5のイソペンテニルピロリン酸、および、その異性体のジメチルアリルピロリン酸とが結合することによって、炭素数10のモノテルペンであるゲラニルピロリン酸が生成する。さらに、このような炭素数5の化合物が重合を繰り返して、種々のテルペン類、精油、樹脂、カロチノイド、天然ゴム、ステロイド等が合成される。これら化合物は、特に医薬や食品添加物等の分野において有用であり、多くの場合には植物から抽出されている。そこで、このような化合物を植物内で多く合成するために、酢酸メバロン酸経路の代謝能力を向上させる技術が望まれている。米国特許第5349126号には、酢酸メバロン酸経路における鍵酵素であるメバロン酸生成を触媒する酵素、即ち、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイムAリダクターゼ（以下、HMG-CoA リダクターゼと記す。）の遺伝子を動物細胞からクローニングし、クローニングされた動物由来の遺伝子を植物細胞内に導入することによりHMG-CoA リダクターゼを植物細胞内で過剰発現させる方法が開示されている。該方法によれば、酢酸メバロン酸経路の最終的代謝産物であるカンベステロール、シクロアルテノール、シトステロール、ステイグマステロール、スクアレンを増加させることが可能になる旨の記載がある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】ところで、HMG-CoA リダクターゼは、植物細胞内でリン酸化を受けた状態では活性を示さない酵素であり、該酵素が植物細胞内で脱リン酸化されることによりはじめて活性を示す状態になる。このため、HMG-CoA リダクターゼを植物細胞内で単に過剰発現させるだけでは必ずしも十分に該酵素の活性を増加させることはできない。

【0004】

【課題を解決するための手段】このような状況下、本発明者らは鋭意検討を行った結果、ある種のリン酸化能を

有するプロテインキナーゼが実質的に該活性を示さないように、該酵素の遺伝子を改変し、この改変された遺伝子を植物細胞内に導入することにより、植物細胞内においてリン酸化を受けた状態で存在する酵素の割合を減少させ、逆に脱リン酸化の状態にある酵素の割合を増加させることに成功し、本発明を完成した。即ち、本発明は、

1. 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイムA (HMG-CoA) リダクターゼ活性を有する植物の細胞内に、(1) 植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2) 配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼの遺伝子、及び(3) 植物細胞内で機能可能なターミネーター、を機能可能な形で有する発現カセットを導入することにより該植物内でのHMG-CoA リダクターゼ活性を増加させる方法、

2. 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイムA (HMG-CoA) リダクターゼ活性を有する植物の細胞内に、(1) 植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2) 配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼの触媒領域のサブドメインIIにおいて保存されているリジンを経他のアミノ酸に置換することにより得られるプロテインキナーゼの遺伝子、及び(3) 植物細胞内で機能可能なターミネーター、を機能可能な形で有する発現カセットを導入することにより該植物内でのHMG-CoA リダクターゼ活性を増加させる方法、

3. 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイムA (HMG-CoA) リダクターゼ活性を有する植物の細胞内に、(1) 植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2) HMG-CoA リダクターゼをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼの遺伝子、及び(3) 植物細胞内で機能可能なターミネーター、を機能可能な形で有する発現カセットを導入することにより該植物内でのHMG-CoA リダクターゼ活性を増加させる方法、

4. (1) 植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2) 配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼの遺伝子、及び(3) 植物細胞内で機能可能なターミネーター、を機能可能な形で有する発現カセットが細胞内に導入された植物、

5. (1) 植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2) 配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロで

リン酸化する活性を示すプロテインキナーゼの触媒領域のサブドメインIIにおいて保存されているリジンを経他のアミノ酸に置換することにより得られるプロテインキナーゼの遺伝子、及び(3) 植物細胞内で機能可能なターミネーター、を機能可能な形で有する発現カセットが細胞内に導入された植物、

6. (1) 植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2) HMG-CoA リダクターゼをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼの遺伝子、及び(3) 植物細胞内で機能可能なターミネーター、を機能可能な形で有する発現カセットが細胞内に導入された植物、を提供するものである。

【0005】

【発明の実施の形態】本発明は、植物細胞内でHMG-CoA リダクターゼを効率よく脱リン酸化状態にする技術に関する。以下、さらに詳細に本発明を説明する。本発明で用いる遺伝子工学的手法は例えば、J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis著；モレキュラー クローニング 第2版 (Molecular Cloning 2nd edition)、コールドスプリング ハーバー ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory) 発行、1989年等に記載される通常の方法に準じて実施できる技術である。プロテインキナーゼとは、アデノシン-3-リン酸(ATP)の γ -リン酸基を特定のタンパク質のセリン、トレオニンまたはチロシンのヒドロキシル基へ転移する反応を触媒する酵素 (EC 2.7.1.37.) である。

【0006】まず、「配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼの遺伝子」について説明する。該遺伝子とは、配列番号1、即ち、(N)-His Met Lys Tyr Asn Arg Ser Thr Lys Asp Val Thr Lys Ala Ser-(C)で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼを暗号化している構造遺伝子を意味する。用いられるプロテインキナーゼの遺伝子が上記の遺伝子であるかどうかは、配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチドを通常の方法により合成し、合成されたペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンを用いられるプロテインキナーゼがインビトロでリン酸化できるかどうかをプロテインキナーゼの改変の前後において調べることにより簡便に検定できる。

【0007】具体的な方法として、例えば、次の方法を用いることができる。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 遺伝子と用いられるプロテインキナーゼ遺伝子との融合遺伝子がtac プロモーター制御下で発現で

きるような大腸菌発現ベクターを構築し、構築された大腸菌発現ベクターにより形質転換した大腸菌を培養する。尚、tac プロモーター、GST 遺伝子を含む大腸菌発現ベクターはファルマシア社から購入することができる。あるいは、D. B. Smith らのGene, 67, 31-40 (1988)に記載の方法に準じて構築することもできる。培養後、集菌された大腸菌をL緩衝液(50mM Tris-HCl (pH7.5), 25% ショ糖)等に懸濁した後、ソニケーターで菌体を破碎することにより得られた無細胞抽出物をGlutathione-Sepharose 4B (ファルマシア社)に吸着させる(4℃で終夜回転処理)。遠心分離で融合タンパク質を吸着したGlutathione-Sepharose 4Bを集め、WE緩衝液(20mM Tris-HCl (pH7.5), 2mM MgCl₂, 1mM DTT)等に懸濁し、遠心分離した後、再び少量のWE緩衝液等に懸濁する。つぎに、該懸濁液中に含まれるGlutathione-Sepharose 4Bに吸着した融合タンパク質を、配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド、 γ^{33} あるいは γ^{32} P-ATPを含む緩衝液中に混合することにより反応させる。反応後、上記のペプチドをリン酸セルロース紙、アニオン交換カラム、薄層電気泳動等の方法により分離および/または回収し、該ペプチドから放射能が検出される否かを通常の方法により調べる(J. E. Casnellie, Methods in Enzymology, 200, 115-120 (1991)参照)。上記の方法では、用いられるプロテインキナーゼ遺伝子が、配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を実質的に示さないプロテインキナーゼの遺伝子であれば、ほとんど検出されないのに対し、そうでない場合では、放射能が検出される。このようにして、プロテインキナーゼの改変の前後においてリン酸化能を検定することにより、用いられるプロテインキナーゼ遺伝子が、配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に活性を示さないように改変したプロテインキナーゼの遺伝子であるかどうかを確認することができる。

【0008】本発明では、「配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼ」の遺伝子として、例えば、配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼの触媒領域のサブドメインIIにおいて保存されているリジンに他のアミノ酸に置換することにより得られるプロテインキナーゼの遺伝子を使用することができる。ここで、触媒領域とは、T. Hunter によってMethod in Enzymology, 200, 3-37 (1991)の表1に示されている触媒領域を

示し、また他のアミノ酸とは、該アミノ酸の残基に対しATPが結合しないようなアミノ酸を意味し、例えば、アルギニンをあげることができる。タバコNPK5プロテインキナーゼを用いる場合、触媒領域のサブドメインIIにおいて保存されているリジンに相当する48番目のリジンをアルギニンに置換することにより目的とする「配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を実質的に示さないように改変したプロテインキナーゼ」を得ることができる。また、ラットAMPKプロテインキナーゼを用いる場合、触媒領域のサブドメインIIにおいて保存されているリジンに相当する45番目のリジンをアルギニンに置換することにより目的とする

「配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を実質的に示さないように改変したプロテインキナーゼ」を得ることができる。

【0009】もちろん、本発明では、「配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼ」の遺伝子として、HMG-CoA リダクターゼをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼの遺伝子も使用することができる。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)遺伝子と用いられるプロテインキナーゼ遺伝子との融合遺伝子がtac プロモーター制御下で発現できるような大腸菌発現ベクターを構築し、構築された大腸菌発現ベクターにより形質転換した大腸菌を培養する。尚、tac プロモーター、GST 遺伝子を含む大腸菌発現ベクターはファルマシア社から購入することができる。あるいは、D. B. Smith らのGene, 67, 31-40 (1988)に記載の方法に準じて構築することもできる。培養後、集菌された大腸菌をL緩衝液(50mM Tris-HCl (pH7.5), 25% ショ糖)等に懸濁した後、ソニケーターで菌体を破碎することにより得られた無細胞抽出物をGlutathione-Sepharose 4B (ファルマシア社)に吸着させる(4℃で終夜回転処理)。遠心分離で融合タンパク質を吸着したGlutathione-Sepharose 4Bを集め、WE緩衝液(20mM Tris-HCl (pH7.5), 2mM MgCl₂, 1mM DTT)等に懸濁し、遠心分離した後、再び少量のWE緩衝液等に懸濁する。つぎに、該懸濁液中に含まれるGlutathione-Sepharose 4Bに吸着した融合タンパク質を、ニコチアナ シルベストリス(Nicotiana sylvestris)由来のHMG-CoA リダクターゼ、 γ^{33} あるいは γ^{32} P-ATPを含む緩衝液中に混合することにより反応させる。反応後、上記のHMG-CoA リダクターゼを熱処理した後、Gel loading 緩衝液を加え10-20%SDS-PAGEにかける。電気泳動後、ゲルをクーマシーブルーで染色し、乾燥後、オートラジオグラフィーを行う。上記

の方法では、用いられるプロテインキナーゼ遺伝子が、HMG-CoA リダクターゼをリン酸化する活性を実質的に示さないプロテインキナーゼの遺伝子であれば、期待されるHMG-CoA リダクターゼ分子量の位置にシグナルがほとんど検出されないのに対し、そうでない場合には、期待される分子量の位置にシグナルが放射能が検出される。このようにして、プロテインキナーゼの改変の前後においてリン酸化能を検定することにより、用いられるプロテインキナーゼ遺伝子が、HMG-CoA リダクターゼをリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼの遺伝子であるかどうかを確認することができる。

【0010】本発明で用いられる「植物細胞内で機能可能なプロモーター」とは、植物細胞内で機能可能な転写および翻訳開始等の遺伝子発現調節に関与する領域を有する遺伝子のことであり、たとえば、ノバリン合成酵素遺伝子(NOS) プロモーターやオクトピン合成酵素遺伝子(OCT) プロモーターといったアグロバクテリウム・ツメファシエンスのT-DNA 由来の構成的プロモーター、または、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV) 由来の19S や35S プロモーターといった植物ウイルス由来のプロモーター、または、タバコ由来のParA遺伝子プロモーター等をあげることができる。また、その他の公知の植物由来のプロモーターもあげられる。

【0011】本発明で用いられる「植物細胞内で機能可能なターミネーター」とは、植物細胞内で機能可能な転写終結等の遺伝子発現調節に関与する領域を有する遺伝子のことであり、たとえば、T-DNA 由来のNOS ターミネーター等の植物由来のターミネーター、ニンニクウイルスGV1 や GV2のターミネーター等のウイルス由来のターミネーター等をあげることができる。また、その他の公知の植物由来のターミネーターもあげられる。

【0012】(1) 植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2) 配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼの遺伝子、及び(3) 植物細胞内で機能可能なターミネーターを機能可能な形で有する発現カセットは、DNA リガーゼの作用によって連結する通常の方法により、「植物細胞内で機能可能なプロモーター」と「植物細胞内で機能可能なターミネーター」の間に「配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼの遺伝子」が位置するように、必要に応じてリンカー等を用いて構築すればよい。ここで述べる「リンカー」は着目するDNA 末端に結合させ、目的とする制限酵素認識配列を導入することを可能にする2本鎖の合成DNA を指す。こ

のように構築された発現カセットは、「植物細胞内で機能可能なプロモーター」と「配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼの遺伝子」が機能可能な形で結合し、そして「配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼ」を発現することのできる遺伝子構築体である。尚、特定植物中で機能する、あるいは特定の植物器官で特異的に機能することができるプロモーターを選択することによって任意の発現形態の改変植物を得ることも可能となる。たとえば、根部特異的に発現するプロモーターを用いることにより、根部に特異的に「配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼ」を発現させることができ、酢酸メバロン酸経路の代謝能力を根部に特異的に向上させることが可能となる。また、逆に組織特異性のない植物ウイルス由来のプロモーターを用いることにより、組織特異性なく「配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼ」を発現させることができ、酢酸メバロン酸経路の代謝能力を植物全体で向上させることが可能となる。

【0013】このようにして構築された発現カセットを、例えば、イネ、トウモロコシ、モロコシ、ライムギ、オオムギ、コムギ、タマネギ等の单子葉植物、ダイズ、エンドウ、インゲン、アルファルファ等のマメ科植物；タバコ、トマト、ナス、ジャガイモ等のナス科植物、ダイコン、ナタネ、キャベツ、シロイヌナズナ等のアブラナ科植物；メロン、キュウリ、カボチャなどのウリ科植物；ニンジン、セロリ等のセリ科植物；レタス等のキク科植物等の双子葉植物等に導入する方法としては、植物種によって異なるが、土壌細菌であるアグロバクテリウムの感染を利用する方法やプロトプラストへのエレクトロポレーションにより遺伝子を導入する方法、植物組織あるいはプロトプラストへのパーティクルガンにより遺伝子を導入する方法等の通常の方法をあげることができる。そして構築させた発現カセットが導入された植物細胞は、植物組織培養技術において通常用いられる方法に準じて再生され、植物体として得ることができる。このような方法は、例えば、S. B. Gelvin, R. A. Schilperoort and D. P. S. Verma著；プラントモレキュラー バイオロジー／マニュアル(Plant Molecular Bio

logy/Manual)、ルアー アカデミック パブリッシャーズ(Kluwer Academic Publishers)発行、1988年等に記載されている。

【0014】具体的には、例えば、イネへの遺伝子導入にはパーティクルガン法を用いることができる。イネ種子を脱穀、粉すり後、オーキシンを含む Linsmaier and Skoog(LS)培地(Physiol. Plant. 18, 100-127 (1965))で培養し、胚を脱分化を図る。脱分化して大きくなった胚を切取り、オーキシンを含むLS寒天培地に置床する。前記のようにして構築された発現カセット、および、抗生物質等の薬剤耐性マーカー用プラスミドを混合し、パーティクルガンによって、寒天培地に置床した胚に遺伝子を導入する。この胚を抗生物質等の薬剤と植物ホルモンを含むLS培地で無菌的に選抜培養する。さらに、増殖した胚由来カルスを抗生物質等の薬剤を含むLS培地上で選抜し、抗生物質等の薬剤耐性遺伝子が導入された再生個体を得る。これらの選抜植物からゲノムDNAを調製し、PCR もしくはサザンブロット解析により「配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示すプロテインキナーゼを実質的に該活性を示さないように改変したプロテインキナーゼの遺伝子」が挿入された植物体を選抜する。本発明に従えば、形質転換植物におけるHMG-CoA リダクターゼキナーゼの活性が低下し、そしてHMG-CoA リダクターゼの活性を増加させることができる。そして HMG-CoAリダクターゼによって合成されたメバロン酸、及び、その下流の代謝産物である種々のテルペン類、精油、樹脂、カロチノイド、天然ゴム、ステロイド等の化合物の合成が促進される。さらに、本発明の副次的な効果として、植物の根の伸長増加が認められた。根の伸長増加は、乾燥地における生育の増加、強風などに対する倒伏防止、根での有用物質生産の増加などに利用できる。

【0015】

【実施例】以下、実施例により詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0016】実施例1 (インビトロにおけるペプチドのリン酸化)

配列番号1及び2で示されるアミノ酸配列であるペプチドを自動アミノ酸合成装置(Per Septive Biosystems 製、9050 Peptide Synthesizer)により合成した。タバコプロテインキナーゼNPK5をコードするDNA(cNPK5)を、Mol. Cell. Biol., 14, 2958-2965 (1994)に記載される方法に準じて、タバコプロテインキナーゼ遺伝子断片CC5(配列番号3で示される塩基配列)をプローブとし、タバコ培養細胞BY-2(Kato et al. (1972) Liquid suspension culture of tobacco cells, p. 689-695. In G. Terui (ed.) Fermentation technology today. Society of Fermentation Technology, Osaka, Japan. 等に記載され、例えば、東京大学理学部植物学講座で分譲

可能な状態で保管されている)から調製したcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより得た。得られたcNPK5の全長を含むBamHI断片を、プラスミドpUC18のBamHI部位に挿入することによりpXK1を構築した。尚、pXK1は、cNPK5の5'側にpUC18のマルチクローニングサイトのXbaIが、cNPK5の3'側にpUC18のマルチクローニングサイトのKpnIが、配置される構造となったものである。プロテインキナーゼにおける触媒領域のサブドメインIIにおいて保存されるリジンに相当する、タバコプロテインキナーゼNPK5の48番目のリジンをアルギニンに置換するために、pXK1を鋳型としたPCRによる塩基置換法(PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, Calif. Gelfandら編、p. 177-183 (1990)に記載されている)によりcNPK5の塩基配列293番目のアデニン残基をグアニン残基に置換し、pXK1(K48R)を構築した。次に、NPK5遺伝子の翻訳開始点のすぐ上流にBamHIで認識できる塩基配列をPCR法によって導入し(導入後の塩基配列は、GGGATCCCCATG—〔以下、cNPK5の塩基配列が続く〕に相当する)、NPK5の全翻訳塩基配列を含むBamHI断片を、tacプロモーター制御下でグルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子が発現できるような大腸菌発現ベクターであるpGEX-3X(ファルマシア社から購入)のクローニングサイトであるBamHIに、グルタチオン-S-トランスフェラーゼとタバコプロテインキナーゼNPK5との融合タンパク質ができるようにフレームの合う方向に導入し、大腸菌発現ベクターpGEX-NPK5を構築した。同様に、NPK5(K48R)遺伝子の翻訳開始点のすぐ上流にBamHIで認識できる塩基配列をPCR法によって導入し(導入後の塩基配列は、GGGATCCCCATG—〔以下、cNPK5の塩基配列が続く〕に相当する)、NPK5(K48R)の全翻訳塩基配列を含むBamHI断片を、tacプロモーター制御下でグルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子が発現できるような大腸菌発現ベクターであるpGEX-3X(ファルマシア社から購入)のクローニングサイトであるBamHIに、グルタチオン-S-トランスフェラーゼとタバコプロテインキナーゼNPK5(K48R)との融合タンパク質ができるようにフレームの合う方向に導入し、大腸菌発現ベクターpGEX-NPK5(K48R)を構築した。このようにして構築したそれぞれの大腸菌発現ベクターpGEX-NPK5、pGEX-NPK5(K48R)で、大腸菌JM109株(宝酒造製)を形質転換した。尚、大腸菌JM109株は、塩化カルシウム法によって調製したコンピテントセルを東洋紡績株式会社から購入し、添付されたマニュアルに従って形質転換された。pGEX-NPK5、pGEX-NPK5(K48R)でそれぞれ形質転換した大腸菌で産生される融合タンパク質を、それぞれ、GST-NPK5、GST-NPK5(K48R)と命名した。pGEX-NPK5、pGEX-NPK5(K48R)でそれぞれ形質転換した大腸菌を、5mlのL-ブロスに100μg/mlのアンピシリンを添加した液体培地で28℃で終夜培養した。その後、150mlのL-ブロスに100μg/mlのアンピシリンを

添加した液体培地に終夜培養した菌液を1.5 ml加え、28℃で7時間培養した。7時間後に最終濃度2mMの5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシドを添加し、さらに15時間、28℃で培養した。培養後、集菌された大腸菌をL緩衝液(50mM Tris-HCl (pH7.5), 0.12mM PMSF, 1mM MgCl₂, 25%(w/v) ショ糖) 40ml に懸濁した後、ソニケーター (BRANSON 製, SONIFIER 250) で菌体を破碎 (条件: 出力60, cycle 70, 5分間×4回) した。該破碎物を遠心分離 (4℃, 5000g, 15min) し、上清を回収することにより無細胞抽出物を得た。得られた無細胞抽出物40mlをGlutathione-Sepharose4B (ファルマシア社) 1ml (50%スラリー) に吸着させた (4℃で終夜回転処理)。遠心分離 (4℃, 1000g, 5min) で融合タンパク質 (GST-NPK5、GST-NPK5(K48R)) を吸着した Glutathione-Sepharose 4Bを集め、40mlのWE緩衝液 (20mM Tris-HCl (pH7.5), 2mM MgCl₂, 1mM DTT) に懸濁し、遠心分離 (4℃, 1000g, 5min) した。この操作

を2回繰り返した後、1mlのWE緩衝液に懸濁した。つぎに、該懸濁液1ml中に含まれるGlutathione-Sepharose 4Bに吸着した融合タンパク質のうち、5μgを、配列番号1あるいは配列番号2で示されるアミノ酸配列であるペプチド 200μM、γ³³P-ATP (370MBq/ml) 1μl, NaCl 80mM, glycerol 8%, EDTA 0.8mM, DTT 0.8mM, MgCl₂ 5mM を含む40mM HEPES緩衝液 (pH 7.0) 中に混合する (総量 25 μl) ことにより反応させた (30℃, 10分間)。反応後、反応液のうち15μlを1cm 角のリン酸セルロース紙に吸着させた。該リン酸セルロース紙を一旦乾燥した後、500ml の1%リン酸で3回洗浄し、ついでアセトンで1回洗浄してから再び乾燥した。乾燥したリン酸セルロース紙を5mlのシンチレーターに入れ、放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。その結果を表1に示す。

【0017】

【表1】

供試ペ プチド	融合タン パク質	放射能(cpm)	バックグラウンドの値 を引いた比放射能(cpm)
なし	GST-NPK5	3750	0
配列番号1	GST-NPK5	8200	4450
配列番号2	GST-NPK5	7700	3950
なし	GST-NPK5(K48R)	1600	0
配列番号1	GST-NPK5(K48R)	1550	-50
配列番号2	GST-NPK5(K48R)	1630	30

【0018】上記のペプチドを添加しない系との比較、すなわちバックグラウンドの値を引いた値で見ると、融合タンパク質 GST-NPK5 の場合、配列番号1及び2で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示した。これに対してタバコプロテインキナーゼ NPK5の触媒領域のサブドメインIIにおいて保存されているリジンに相当する48番目のリジンをアルギニンに置換した融合タンパク質、即ち、融合タンパク質 GST-NPK5 (K48R) の場合、配列番号1及び2で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示さなかった。以上の結果より、タバコプロテインキナーゼNPK5は、正常時には配列番号1及び2で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示し、かつ、上記のようなアミノ酸置換後には、配列番号1及び2で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性を示さないことが確認された。

【0019】実施例2 (発現カセットの構築)

マーカー遺伝子としてカナマイシン耐性遺伝子 (NPT I I)、ハイグロマイシン遺伝子 (HPT)、及びレポーター遺伝子としてβ-グルクロニダーゼ遺伝子 (GUS) を持つバイナリベクターであるpIG121HM (Nucleic Acids Res. 19, p.6373-6378, 1991) を制限酵素SacIで処理した後、T4ポリメラーゼ処理を行い平滑末端化した。その後XbaI処理し、電気泳動によってベクター部分と挿入遺伝子部分とに分け、ベクター部分を切りだし、BioTechniques, 9, p.92-99(1990) に記載の方法に準じたガラスマトリックスによる吸着法によりベクター部分を回収した。つぎに、タバコプロテインキナーゼNPK5をコードするDNAを含むpXK1 (実施例1で構築された) 及びタバコプロテインキナーゼNPK5の触媒領域のサブドメインIIにおいて保存されているリジンに相当する48番目のリジンをアルギニンに置換したタバコプロテインキナーゼ、即ち、アミノ酸置換タバコプロテインキナーゼNPK5(K48R) をコードするDNAを含むpXK1(K48R) (実施例1で構築された) をそれぞれSmaI及びXbaIで処理した後、電気泳動によってベクター部分と挿入遺伝子部分とに分け、挿入遺伝子部分を切りだし、BioTechniques, 9, 92-99(1990) に記載の方法に準じたガラスマトリックスによる吸

着法により挿入遺伝子部分を回収した（以下、cNPK5およびcNPK5(K48R)と記す。）。上記で調製したバイナリベクターであるpIG121HMのベクター部分と、cNPK5あるいはcNPK5(K48R)をライゲーションさせ、それぞれ、p35S-cNPK5あるいはp35S-cNPK5(K48R)を構築した（図1参照）。このようにして構築されたプラスミドは、選抜マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子(HPT)とカナマイシン耐性遺伝子(NPTII)を有し、両者の間にタバコプロテインキナーゼNPK5遺伝子あるいは上記のアミノ酸置換タバコプロテインキナーゼNPK5(K48R)遺伝子を含む断片が挿入されている。したがって、ハイグロマイシンとカナマイシンの両方に耐性を有するクローンを選抜すれば、タバコプロテインキナーゼNPK5あるいは上記のアミノ酸置換タバコプロテインキナーゼNPK5(K48R)を発現するクローンを取得することができる。

【0020】実施例3（タバコの形質転換）

実施例2で得られたp35S-cNPK5及びp35S-cNPK5(K48R)並びに対照としてpIG121HMを、アグロバクテリウム・ツメファシエンスEHA101株（J.Bacteriol., 168, p. 1291-1301, 1986 に記載され、Department of Biology, Washington University, St. Louis, Missouri 等に分譲可能な状態で保管されている）に、エレクトロポレーション法（条件：抵抗200 オーム、電気容量25 μ F、電圧2.5kV）によって導入した。形質転換体は、導入されたプラスミドが有するハイグロマイシン耐性遺伝子(HPT)とカナマイシン耐性遺伝子(NPTII)により付与されるカナマイシンおよびハイグロマイシンに対する薬剤耐性を利用してカナマイシン50 μ g/ml、ハイグロマイシン20 μ g/mlを含むL培地(bacto-trypton 10g, yeast extract 5g, NaCl 5g, 水1 L (pH7.0))で選択することにより得られた。得られた形質転換体であるアグロバクテリウム・ツメファシエンスをカナマイシン50 μ g/ml、ハイグロマイシン20 μ g/mlを含むL培地で30℃、一夜培養し、得られた菌液を村中ら、植物細胞工学, Vol. 4, p. 193-203, 1992 に記載の方法に準じてタバコ葉部の切片に感染させた後、カナ

マイシン、ハイグロマイシンによる選抜を行いながらカルス化、再分化を経て遺伝子組換え体タバコ植物を得た。

【0021】実施例4（形質転換タバコの自殖）

遺伝子組換え体タバコ植物(T1世代とする)を温室で栽培し、自殖させることにより自殖第1世代(T2世代とする)の種子を得た。さらに、T2植物の種子をカナマイシン、ハイグロマイシンによる選抜で発芽した植物を温室で栽培し、自殖させることにより自殖第2世代(T3世代とする)の種子を得た。さらに、T3植物の種子を発芽させ、温室で栽培することによりT3世代の形質転換幼植物を得た。

【0022】実施例5（形質転換タバコにおけるペプチドのリン酸化）

実施例4で得られたT3世代の形質転換幼植物の葉(50mg)を、氷冷下、1mlの0.25M mannitol, 1mM EDTA, 2mM DTT, 1mM PMSFを含む50mM Tris-HCl 緩衝液(pH8.0)中で乳鉢ですりつぶし、細胞内に蓄積された酵素を抽出し、遠心分離(4℃, 5000g, 10min)で上清(粗酵素液)を得た。得られた上清(粗酵素液)(5 μ g protein)、配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド 200 μ M、 γ -³²P-ATP (370MBq/ml) 1 μ l, NaCl 80mM, glycerol 8%, EDTA 0.8mM, DTT 0.8mM, MgCl₂ 5mMを含む40mM HEPES緩衝液(pH7.0)中に混合する(総量 25 μ l)ことにより反応させた(30℃、10分間)。反応後、反応液のうち20 μ lを1cm角のリン酸セルロース紙に吸着させた。該リン酸セルロース紙を一旦乾燥した後、500mlの1%リン酸で3回洗浄し、ついでアセトンで1回洗浄してから再び乾燥した。乾燥したリン酸セルロース紙を5mlのシンチレーターに入れ、放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。その結果を表2に示す。

【0023】

【表2】

導入プラスミド	クローン名	放射能(cpm)	
pIG121HM (対照)	5-2-1	6400	100
p35S-cNPK5	6-1-2	6200	96.9
p35S-cNPK5	6-2-1	6500	101.6
p35S-cNPK5(K48R)	7-1-1	5150	80.5
p35S-cNPK5(K48R)	7-2-3	3200	50.0

【0024】タバコプロテインキナーゼNPK5を発現させたクローンの場合、配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸化する活性が低下しなかつ

たのに対し、上記のアミノ酸置換タバコプロテインキナーゼNPK5(K48R)を発現させたクローンの場合、配列番号1で示されるアミノ酸配列であるペプチド内のN末端から7番目のアミノ酸であるセリンをインビトロでリン酸

化する活性が低下した。

【0025】実施例6 (形質転換タバコ、単離根の伸長増加1)

実施例4で得られたT2世代の滅菌処理した種子を滅菌しシュクロース無添加のLS培地 (Physiol. Plant, 18, p.100-127, 1965) 上に置床し、4℃、1日処理後、23℃、16時間日長下で4週間培養した。その後、根端から約1cmを切取り、シュクロース3%のLS培地に、1クローン当たり10-15枚の角プレートにつき各10本の根を置床した。根の先端部をマークし、8週間目に、伸長した根の長さを測定した。その結果を図2に示す。pBI121HM (対照) を導入した遺伝子組換え体タバコ植物の単離根の場合、全てのサンプルで根の伸長が20mm以下であり、大部分が10mm以下であった。そして、p35S-cNPK5を導入した遺伝子組換え体タバコ植物の単離根の場合、全ての

サンプルで根の伸長が35mm以下であり、大部分が10mm以下であった。これに対して、p35S-NPK5(K48R) を導入した遺伝子組換え体タバコ植物の単離根の場合、全根数の37%以上が20mm以上に伸長し、80mm以上伸長したのも全根数の約7%も存在した。

【0026】実施例7 (形質転換タバコの根の伸長増加)

実施例4で得られたT3世代の滅菌処理した種子を滅菌した種子をLS培地上に置床し、23℃、16時間日長下で培養した。10および17日目に根端部の位置をマークしさらに7日間培養した。培養開始から10, 17, 24日目にマークした点から新たに伸長した根端までの長さを測定した。その結果を表3に示す。

【0027】

【表3】

導入プラスミド	クローン名	サンプル数	根の伸長の平均(mm)		
			10日目	17日目	24日目
pIG121HM (対照)	5-1-1	45	7.71	11.73	13.82
pIG121HM (対照)	5-2-1	48	8.50	11.92	12.75
p35S-cNPK5	6-2-1	62	3.66	6.08	6.67
p35S-cNPK5(K48R)	7-1-1	44	8.68	12.95	17.77
p35S-cNPK5(K48R)	7-2-3	47	9.43	19.45	31.85

【0028】p35S-cNPK5を導入した遺伝子組換え体タバコ植物の場合、根の伸長が阻害されたのに対して、p35S-cNPK5(K48R)を導入した遺伝子組換え体タバコ植物の単離根の場合、根の伸長が促進された。

【0029】実施例8 (形質転換タバコ、単離根の伸長増加2)

実施例4で得られたT3世代の滅菌処理した種子を滅菌した種子をシュクロース無添加のLS培地上に置床し、4

℃、1日の条件で低温処理した後、23℃、16時間日長下で4週間培養した。その後、根端から約1cmを切取り、シュクロース3%のLS培地に、角プレート当たり、縦に3列、各8本の根を置床した。根の先端部をマークし、17日目に、伸長した根の長さを測定した。結果を表4に示す。

【0030】

【表4】

導入プラスミド	クローン名	サンプル数	根の伸長の平均(mm)
pIG121HM (対照)	5-1-1	41	0.01
pIG121HM (対照)	5-2-1	43	0.25
p35S-cNPK5	6-2-1	49	0.23
p35S-cNPK5(K48R)	7-1-1	45	11.41
p35S-cNPK5(K48R)	7-2-3	46	9.82

【0031】pBI121HM (対照) を導入した遺伝子組換え体タバコ植物あるいはp35S-cNPK5を導入した遺伝子組換え体タバコ植物の場合、単離根の伸長が大きく阻害されたのに対して、p35S-cNPK5(K48R)を導入した遺伝子組換

え体タバコ植物の場合、単離根の伸長は地上部がついていた場合と同程度に伸長した。

【0032】

【発明の効果】本発明により、植物細胞内でHMG-CoA リ

ダクターゼを効率よく脱リン酸化状態にすることが可能になった。さらに、本発明の副次的な効果として、植物の根の伸長増加を引き起こすことができた。

【0033】

【配列表】

配列

1 His Met Lys Tyr Asn Arg Ser Thr Lys Asp Val Thr Lys Ala Ser 15

【0034】配列番号：2

配列の長さ：15

配列

1 His Met Arg Ser Ala Met Ser Gly Leu His Leu Val Lys Arg Arg 15

【0035】配列番号：3

配列の長さ：410

配列

GGGAAGGGGT CGTTTGGGAA GGTAAATA GCTGAACATA CCTAACAGG GCATAAAGTT 60
GCTGTCAAGA TTCTCAATCG TCGGAAAATC AAGAACATGG AAATGGAAGA AAAAGTGAGA 120
AGGGAAATTA AAATATTGAG ATTGTTTCATG CATCCTCACA TCATTGGGCT GTATGAGGTT 180
GTAGAGACAC CATCAGATAT ATATGTTGTG ATGGAGTATG TGAAATCTGG TGAGCTGTTT 240
GATTACATTG TGGAGAAGGG CAGACTACAA GAGGATGAAG CTGTAAATT CTTCCAGCAG 300
ATAATCTCTG GTGTGGAGTA CTGCCACAGG AACATGGTGG TTCATAGAGA TCTAAAGCCT 360
GAGAACCTCC TTTTGGATTG CAAATGGAAT GTGAAGATCG CCGACTTTGG 410

【図面の簡単な説明】

【図1】 p35S-cNPK5の構築方法を示す図である。

【図2】 p35S-cNPK5(K48R)の構築方法を示す図である。

【図3】 T2世代の遺伝子組換え体タバコ植物の単離根の伸長を示す図である。横軸は伸長した長(mm)、縦軸に度数を示している。pBI121HMを導入した遺伝子組換

配列番号：1

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

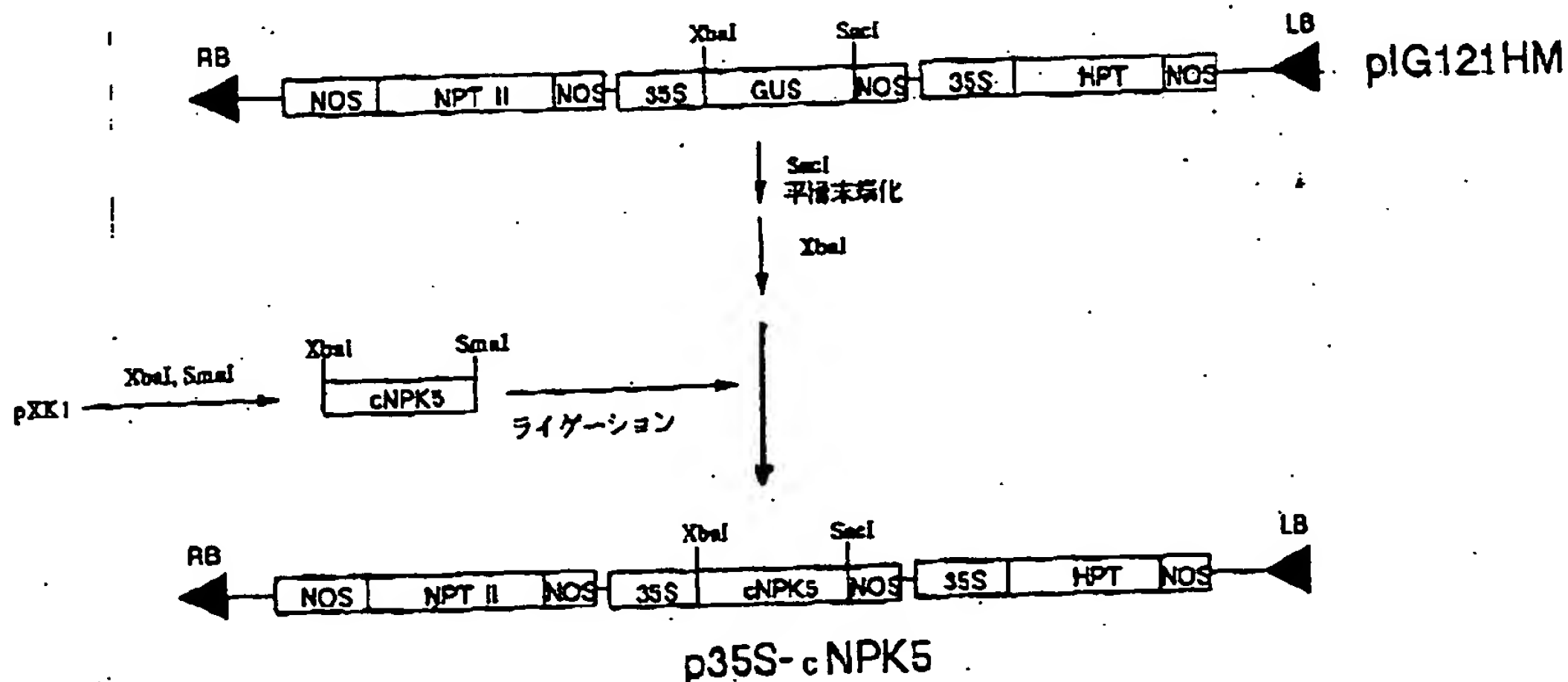
配列の種類：ペプチド

配列の型：核酸

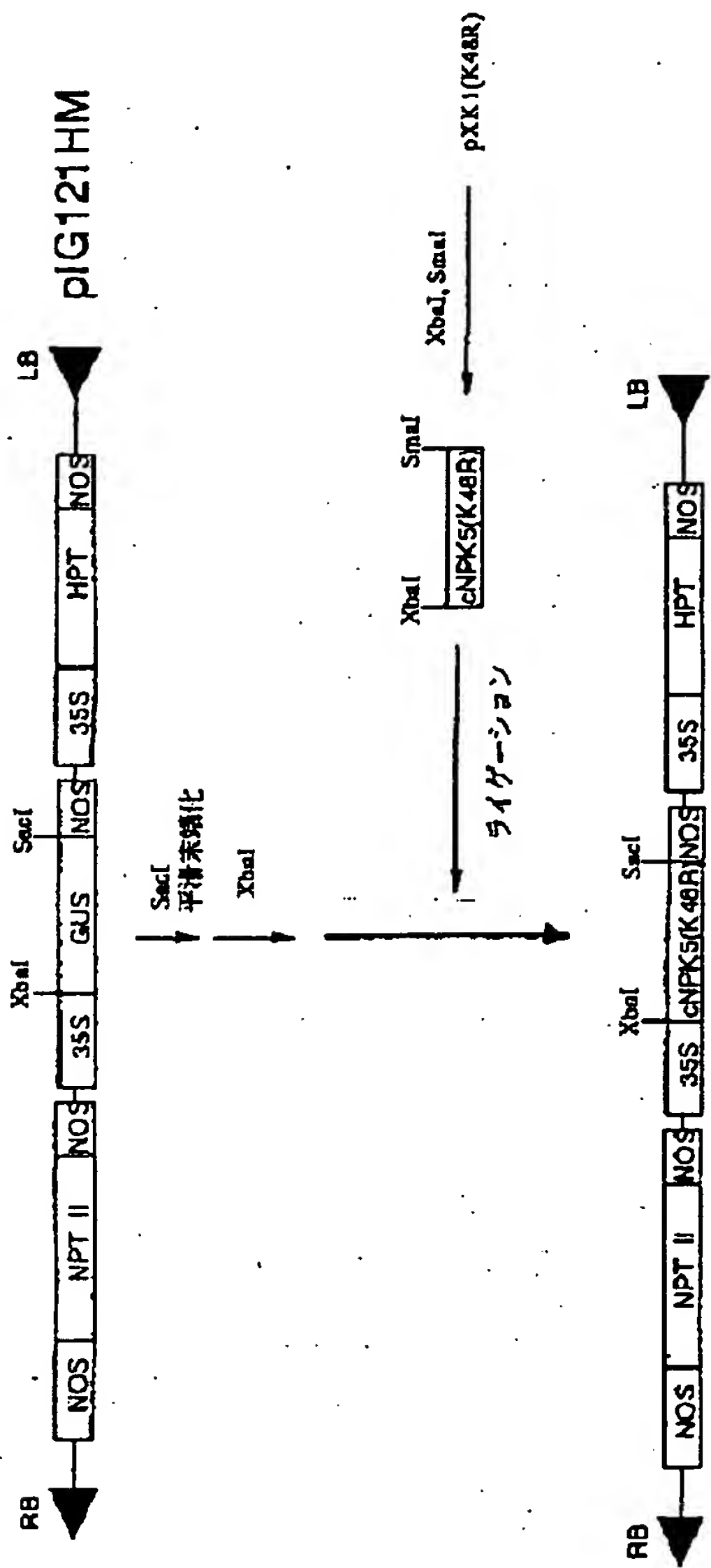
配列の種類：cDNA

え体タバコ植物(対照)の場合、1クローン計145本の根、p35S-cNPK5を導入した遺伝子組換え体タバコ植物の場合、6クローン計541本の根、p35S-cNPK5(K48R)を導入した遺伝子組換え体タバコ植物の場合、6クローン計541本の根を用いた。

【図1】



【図2】



【図3】

